



REC'D 21 SEP 2000

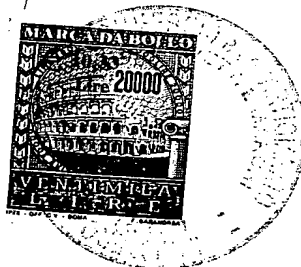
Mod. C.E. - 4-7

WIPO

PCT

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per EP 00/07023

N. FI99 A 000169

EP 00/07023

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

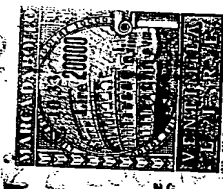
*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

Roma

9 GIU. 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE
IL DIRIGENTE

Dr. Massimo C. Conte



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione BRACCO S.P.A. S.P.
 Residenza MILANO codice 00825120157
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome Livio Brighenti cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.
 via Lungarno Amerigo Vespucci n. 24 città Firenze cap 50123 (prov) FI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____

gruppo/sottogruppo _____

Analoghi di ceramidi, processo per la loro preparazione e loro uso come anti-tumoriali.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) MACCHIA Bruno 3) MACCHIA Marco
 2) BALSAMO Aldo 4) DEL TACCA Mario

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

1) _____
 2) _____

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

1) 2 PROV n. pag. 19 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) 0 PROV n. tav. _____ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare
 Doc. 3) 1 RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
 Doc. 4) 0 RIS designazione inventore
 Doc. 5) 0 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) 0 RIS autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) 0 nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire

trecentosessantacinquemila=

obbligatorio

COMPILATO IL 22 07 1999

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Livio BrighentiCONTINUA S/NO S.INOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO S.I

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

FIRENZEcodice 48

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

FI99A000169

Reg. A

L'anno millenovecento

novantanove

il giorno

ventidue

del mese di

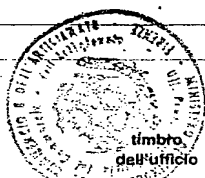
luglio

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 01 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

nessuna

Il DEPOSITANTE

Clignon Mireille

L'UFFICIALE ROGANTE

aw3

A. RICHIEDENTE (I)

NQ

| | | | |
|---------------|--|--------|--|
| Denominazione | | codice | |
| Residenza | | | |
| Denominazione | | codice | |
| Residenza | | | |
| Denominazione | | codice | |
| Residenza | | | |
| Denominazione | | codice | |
| Residenza | | | |
| Denominazione | | codice | |
| Residenza | | | |

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome**cognome nome**[illegible]

F. PRIORITÀ

**allegato
S/R**

nazione o organizzazione**tipo di priorità****numero di domanda****data di deposito**[illegible]

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo**TITOLO DEL (I) RICHIEDENTE (I)**

NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

000169 : 22 LUG 99

FIRENZE/A | INVENZIONI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA **FI99A000169**

REG. A

DATA DI DEPOSITO **22 / 07 / 1999**

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione **BRACCO S.P.A.**Residenza **MILANO**

D. TITOLO

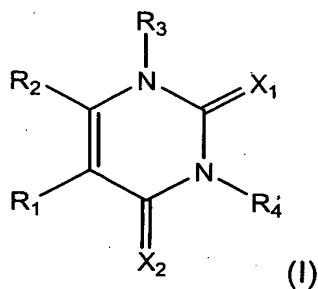
Analoghi di ceramidi, processo per la loro preparazione e loro uso come antitumorali.

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Sono descritti i composti, analoghi di ceramidi, di formula (I):



Sono altresì descritti il processo di preparazione dei composti di formula (I), ed il loro uso per la preparazione di composizioni farmaceutiche per trattamento di tumori.

M. DISEGNO

UFFICIO PROVINCIALE DELL'INDUSTRIA
E DEL COMMERCIO DELLA PROVINCIA DI VENEZIA

Il Firmatario

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo :

"Analoghi di ceramidi, processo per la loro preparazione e loro uso come antitumorali"

Titolare : BRACCO S.p.A.

000169 22LUG99

con sede in : MILANO

FIRENZE/A INVENZIONI

Inventori designati : Bruno MACCHIA, Aldo BALSAMO, Marco

MACCHIA, Mario DEL TACCA, Romano DANESI

Depositata il con il n°

* * * * *

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda i composti, analoghi di ceramidi, di formula generale (I) più avanti riportata, il relativo processo di preparazione, ed il loro uso per la preparazione di composizioni farmaceutiche ad azione antitumorale.

STATO DELLA TECNICA

Le ceramidi sono lipidi costituiti da un acido grasso e sfingosina legati tra loro da un legame ammidico, e sono generate dalla sfingomielina, uno sfingolipide presente nelle membrane di cellule eucariote, per azione dell'enzima sfingomielinasi, oppure sono sintetizzate per azione dell'enzima ceramide sintetasi.

Gli sfingolipidi come la sfingomielina sono stati sempre considerati come componenti strutturali, stabili e metabolicamente inattivi, delle membrane. Solo nell'ultimo decennio si è invece dimostrato che gli sfingolipidi hanno un ruolo attivo nei meccanismi di regolazione delle



FIRENZE
Ufficio Brevetti
Il Funzionario

risposte cellulari a stimoli esogeni, così come nella regolazione di crescita, differenziazione, trasformazione e adesione cellulare.

Si è inoltre recentemente dimostrato che i prodotti di demolizione degli sfingolipidi, quali ceramidi e sfingosina, giocano un ruolo importante nella regolazione dei meccanismi di trasmissione dei segnali controllati dagli sfingolipidi di membrana (Teruyuki Sakai et al., *Exp. Opin. Ther. Patents* (1998) 8 (12): 1673-1682). In particolare, la caratteristica distintiva di questi prodotti sembra essere la loro partecipazione ai meccanismi antiproliferativi di regolazione cellulare, quali ad esempio l'inibizione della crescita, l'induzione alla differenziazione e la morte programmata delle cellule, o apoptosi.

L'apoptosi è stata recentemente oggetto di numerosi studi (ad esempio Ross A. Kinloch et al., *TIPS*, Jan. 1999 (20): 35-42), dal momento che tale fenomeno si presta ad una "manipolazione" farmacologica: una diminuzione della frequenza di comparsa dell'apoptosi cellulare può infatti avere gravi conseguenze patologiche e facilitare la crescita di tumori, da cui il potenziale terapeutico di tutti quei composti che sono in grado di stimolare l'apoptosi.

Da studi approfonditi è risultato che le ceramidi presenti nelle membrane cellulari agiscono come "effettori" intracellulari dell'apoptosi, e quindi come potenziali inibitori della crescita dei tumori.

Al fine di incrementare farmacologicamente tale capacità delle ceramidi endogene, la strategia ottimale sembra essere quella di sviluppare analoghi delle ceramidi endogene che ne mimino gli effetti, che siano stabili nei confronti della metabolizzazione della ceramide a sfingosina e

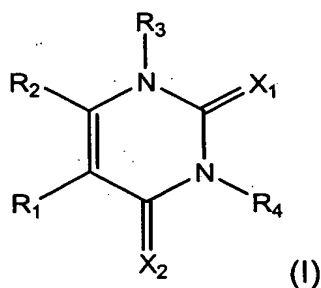
possiedano un'attività inibitoria sulla ceramidasi in modo da prevenire la generazione di sfingosina, che rappresenta un fattore di stimolazione della proliferazione, a partire dalle fonti endogene di ceramidi.

Tali analoghi delle ceramidi dovrebbero inoltre avere la capacità di penetrare le membrane cellulari.

E' pertanto sentita l'esigenza di disporre di composti analoghi di ceramidi, che siano in grado di attraversare le membrane cellulari, di penetrare all'interno delle cellule e di mimare le diverse proprietà delle ceramidi, in particolare quella di indurre l'apoptosi nelle cellule umane cancerose.

SOMMARIO

Ora la Richiedente ha sorprendentemente trovato che i composti analoghi di ceramidi di formula (I) :



in cui

X_1 e X_2 sono scelti tra O e S,

R_1 ed R_2 sono scelti tra $-(CH_2)_{13}CH_3$ e gruppi alchilici o alchilenici con da 2 a 6 atomi di carbonio, lineari o ramificati, non sostituiti o sostituiti con uno o più sostituenti scelti tra gruppi aromatici, amminici primari, secondari e terziari, ammonici quaternari, carbossilici, ossidrilici, eteri, atomi di alogeni o porzioni saccaridiche, con la condizione che uno solo tra R_1 e R_2 sia sempre $-(CH_2)_{13}CH_3$,



R_3 e R_4 sono scelti tra H e gruppi alchilici o alchilenici con da 2 a 6 atomi di carbonio, lineari o ramificati, non sostituiti o sostituiti con uno o più sostituenti scelti tra gruppi aromatici, amminici primari, secondari e terziari, ammonici quaternari, carbossilici, ossidrilici, eterei, atomi di alogeni o porzioni saccaridiche,

sono in grado di penetrare all'interno delle membrane biologiche ed indurre efficacemente l'apoptosi delle cellule cancerose.

I composti di formula generale (I) oggetto della presente invenzione sono quindi risultati adatti alla preparazione di composizioni farmaceutiche per il trattamento di tumori.

Rappresentano pertanto oggetto della presente invenzione i composti di formula generale (I), il relativo processo di preparazione ed il loro uso per la preparazione di composizioni farmaceutiche utili nel trattamento di tumori.

Le caratteristiche ed i vantaggi dei composti di formula generale (I) secondo la presente invenzione saranno illustrati in dettaglio nella seguente descrizione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

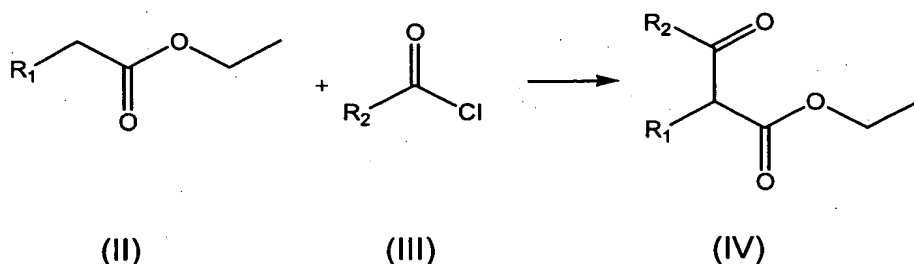
La presente invenzione si riferisce ai composti di formula generale (I) come sopra definiti. Tali composti (I) si sono rivelati in grado di penetrare all'interno delle membrane biologiche ed indurre efficacemente l'apoptosi delle cellule cancerose. Particolarmente efficaci e con una alta citotossicità sono risultati i seguenti composti:

- composto di formula (I) in cui $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 =$ etile, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (3)].

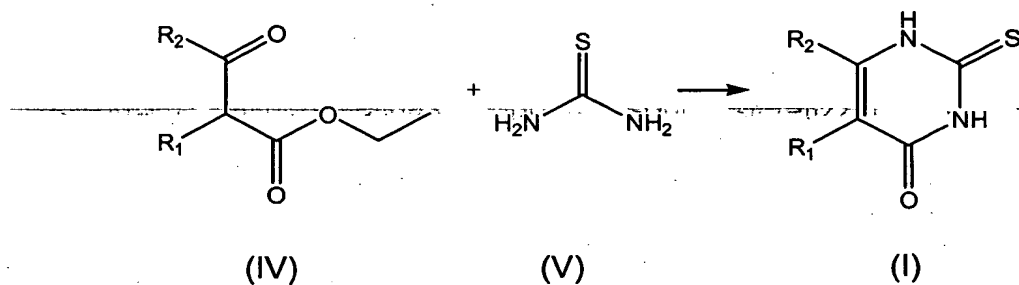
- composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 =$ etile, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (4)].
- composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = n$ -propile, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (6)].
- composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = i$ -butile, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (10)].

Il processo di preparazione dei presenti composti di formula (I) in cui $R_3 = R_4 = H$ comprende i seguenti stadi:

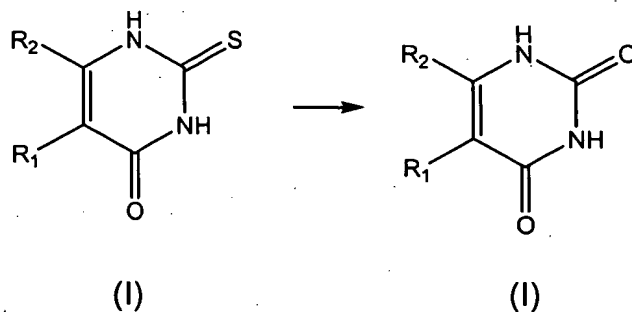
i) reazione dell'etil estere (II) con il cloruro acilico (III) per ottenere il β -chetoestere di formula (IV):



ii) reazione del β -chetoestere di formula (IV) con tiourea (V) per ottenere il composto di formula (I) in cui X_1 è S e X_2 è O:



iii) reazione del composto di formula (I) in cui X_1 è S e X_2 è O con acido cloroacetico a refluxo per ottenere il composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$:



dove X_1 , X_2 , R_1 e R_2 hanno i significati sopra indicati.

Lo stadio i) del presente processo è generalmente condotto in un solvente organico, ad esempio THF, alla temperatura di 0°C. Tale reazione è preferibilmente condotta in atmosfera inerte.

Il prodotto di reazione di formula (IV) può essere recuperato dalla miscela di reazione per aggiunta di una soluzione satura di NH_4Cl e successiva estrazione con etere etilico.

Lo stadio ii) del presente processo è condotto mediante aggiunta di tiourea in etanolo ed etossido di sodio, sul prodotto grezzo di reazione proveniente dallo stadio i), senza bisogno di effettuare alcuna purificazione. Allo stadio ii) la temperatura è mantenuta preferibilmente attorno ai 90°C. Il prodotto di reazione viene generalmente recuperato dalla miscela di reazione per acidificazione a pH 2, ad esempio per aggiunta di HCl conc., e filtrazione del precipitato formatosi, che può essere eventualmente purificato mediante lavaggi con acetone.

Il prodotto di reazione ottenuto allo stadio ii) può essere ulteriormente purificato mediante cromatografia su gel di silice, preferibilmente utilizzando come eluente la miscela acetato di etile : etere di petrolio in rapporto 2 : 1.

Lo stadio iii) del processo secondo la presente invenzione viene generalmente condotto aggiungendo al prodotto proveniente dallo stadio

ii) acido cloroacetico, ad esempio nella forma di soluzione acquosa al 10%, e scaldando a riflusso. Il residuo grezzo così ottenuto può essere purificato mediante lavaggio con etanolo assoluto e poi con etere etilico. Il prodotto proveniente dallo stadio iii) può essere ulteriormente purificato mediante cromatografia su gel di silice, preferibilmente utilizzando come eluente la miscela acetato di etile : esano in rapporto 1 : 2.

I presenti composti di formula (I) in cui R_3 e/o R_4 sono diversi da H possono essere preparati a partire dal β -chetoestere di formula (IV) o dai composti di formula (I) in cui $R_3 = R_4 = H$, ottenuti come sopra descritto, mediante processi noti.

I composti di formula (I) secondo la presente invenzione possono essere formulati con eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili, allo scopo di preparare composizioni farmaceutiche atte al trattamento delle patologie tumorali.

I seguenti esempi sono riportati a scopo illustrativo, ma non limitativo della presente invenzione.

ESEMPIO 1

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_2 = -$
 $(CH_2)_{13}CH_3$, $R_1 = \text{etile}$, e $R_3 = R_4 = H$ (1)

Una soluzione preparata sciogliendo 0,37 g di etil butirrato (3.17 mmoli) in 2 ml di THF anidro viene addizionata goccia a goccia, alla temperatura di 0°C e sotto atmosfera di argon, a 1,9 ml di una soluzione 2M di litio diisopropilammide (LDA) in THF anidro. Dopo 30 minuti di agitazione a 0°C, la miscela di reazione viene addizionata ad di una soluzione ottenuta sciogliendo 1 g di pentadecanoil cloruro (3,8 mmoli) in 5 ml di



THF anidro, precedentemente raffreddata a 0°C. La miscela risultante è mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore, e quindi addizionata di una soluzione satura di NH₄Cl. Si separa la fase organica da quella acquosa, che viene poi estratta con etere etilico. Gli estratti organici vengono riuniti, lavati con soluzione acquosa satura di NaCl, seccati con Na₂SO₄ anidro e quindi evaporati a secchezza per fornire un residuo grezzo (1,20 g) costituito quasi esclusivamente dal β-chetoestere (IV) in cui R₂ = -(CH₂)₁₃CH₃ e R₁ = etile. [¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 0.83-0.94 (m, 6H), 1.07 (t, 3H, J = 7.4 Hz), 1.15-1.36 (m, 24H), 1.81-2.02 (m, 2H), 2.11-2.57 (m, 2H), 3.34 (t, 1H, J = 7.3 Hz), 4.15 (q, 2H, J = 7.3 Hz). MS m/e 340 M⁺].

Il residuo grezzo (1,20 g) contenente il β-chetoestere (IV) in cui R₂ = -(CH₂)₁₃CH₃ e R₁ = etile, così ottenuto, viene disciolto in 20 ml di etanolo assoluto e quindi addizionato con 3,61 g di tiourea (47.5 mmoli) e 6,47 g di sodio etossido (95.1 mmoli). La miscela risultante è mantenuta sotto agitazione per 1 ora a 90°C. Dopo raffreddamento fino a temperatura ambiente, la miscela di reazione è filtrata ed il filtrato è evaporato a secchezza; il residuo così ottenuto viene quindi ripreso con una miscela acqua : THF in rapporto 10 : 1 fino a completa solubilizzazione. La soluzione, raffreddata a 0°C, è acidificata a pH 2 con HCl conc.; il precipitato formatosi, filtrato e lavato con piccole quantità di acetone, fornisce un residuo grezzo che viene purificato per cromatografia su gel di silice eluendo con acetato di etile : etere di petrolio in rapporto 2 : 1, ottenendo infine 290 mg (0,82 mmol; resa = 26%) del composto desiderato di formula (I) (p.f. = 167-169°C; ¹H-NMR (CDCl₃, 200MHz) δ

0.89 (t, 3H, $J = 6.2$ Hz), 1.09 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz), 1.17-1.36 (m, 24H), 2.34-2.49 (m, 4H), 8.88 (br, 1H, D₂O scambiabile), 9.81 (br, 1H, D₂O scambiabile); MS m/e 352 M⁺).

ESEMPIO 2

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$, $R_2 = -$
(CH₂)₁₃CH₃, $R_1 =$ etile, e $R_3 = R_4 = H$ (2)

160 mg (0,45 mmol) del prodotto (1) ottenuto come descritto nell'Esempio 1 vengono addizionati di 11,4 ml di una soluzione acquosa di acido cloroacetico al 10%, e la miscela così ottenuta è riscaldata per 12 ore a riflusso. Il precipitato risultante è quindi filtrato, lavato con etanolo assoluto e successivamente con etere etilico, per ottenere un residuo grezzo che, purificato mediante cromatografia su gel di silice, usando come eluente una miscela acetato di etile : esano in rapporto 1 : 2 ha permesso di ottenere 48 mg (0,14 mmol, resa = 32%) del composto desiderato puro (p.f. 132-134°C; ¹H-NMR (CDCl₃, 200MHz) δ 0.87 (t, 3H, $J = 6.2$ Hz), 1.06 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz), 1.15-1.36 (m, 24H), 2.31-2.49 (m, 4H), 9.06 (br, 1H, D₂O scambiabile), 9.89 (br, 1H, D₂O scambiabile); MS m/e 336 M⁺).

ESEMPIO 3

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -$
(CH₂)₁₃CH₃, $R_2 =$ etile, e $R_3 = R_4 = H$ (3)

Una soluzione ottenuta sciogliendo 1 g di etil palmitato (3.52 mmoli) in 3 ml di THF anidro viene aggiunta goccia a goccia, alla temperatura di 0°C e sotto atmosfera di argon, a 2,1 ml di una soluzione 2M di litio diisopropilammide (LDA) in THF anidro. Dopo 30 minuti di agitazione alla

temperatura di 0°C, la miscela di reazione è aggiunta ad una soluzione ottenuta sciogliendo 2,39 g di propionil cloruro (4.23 mmoli) in 5 ml di THF anidro. La miscela risultante è mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore e quindi addizionata con una soluzione satura di NH_4Cl . La fase organica viene separata da quella acquosa, che è quindi estratta con etere etilico. Gli estratti organici vengono riuniti, lavati con soluzione acquosa satura di NaCl , seccati su Na_2SO_4 anidro e quindi evaporati a secchezza per fornire 1,31 g di un residuo grezzo costituito quasi esclusivamente dal β -chetoestere (IV) in cui $\text{R}_1 = -(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ e $\text{R}_2 = \text{etile}$. [^1H -NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 0.79-0.92 (m, 6H), 1.11 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz), 1.17-1.39 (m, 24H), 1.48-1.62 (m, 2H), 2.26 (q, 2H, $J = 7.6$ Hz), 3.36 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz), 4.15 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz); MS m/e 340 M^+].

1,31 g del residuo grezzo contenente il β -chetoestere (IV) in cui $\text{R}_1 = -(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ e $\text{R}_2 = \text{etile}$, così ottenuto, vengono sciolti in 20 ml di etanolo assoluto, e alla soluzione così ottenuta vengono aggiunti 4,01 g di tiourea (52,8 mmoli) e 7,18 g di sodio etossido (105,6 mmoli). La miscela risultante è mantenuta sotto agitazione per 1 ora a 90°C. Dopo raffreddamento fino a temperatura ambiente, la miscela di reazione è filtrata ed il filtrato viene evaporato a secco; il residuo così ottenuto viene quindi trattato con una miscela di acqua : THF in rapporto 10 : 1 fino a completa solubilizzazione. La soluzione ottenuta, raffreddata a 0°C, è portata a pH 2 con HCl conc.; il precipitato formatosi per acidificazione, filtrato e lavato con piccole quantità di acetone, consente di ottenere un residuo grezzo che, purificato per cromatografia su gel di

silice usando come eluente la miscela acetato di etile : etere di petrolio in rapporto 2 : 1, fornisce 310 mg (0,88 mmol ; resa = 25%) di un prodotto che risulta essere il composto desiderato **3** puro (p.f. 100-102°C ; ¹H-NMR (CDCl₃, 200MHz) δ 0.88 (t, 3H, J = 6.4 Hz), 1.01 (t, 3H, J = 7.4 Hz), 1.18-1.38 (m, 24H), 2.35 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 2.48 (q, 2H, J = 7.6 Hz), 9.08 (br, 1H, D₂O scambiabile), 9.73 (br, 1H, D₂O scambiabile) ; MS m/e 352 M⁺).

ESEMPIO 4

Preparazione del composto di formula (I) in cui X₁ = X₂ = O, R₁ = - (CH₂)₁₃CH₃, R₂ = etile, e R₃ = R₄ = H (4)

A 160 mg (0,45 mmol) del composto (**3**) ottenuto come descritto nell'Esempio 3 vengono aggiunti 11,4 ml di una soluzione acquosa di acido cloroacetico al 10%, e la miscela così ottenuta è riscaldata per 12 ore a riflusso. Il precipitato risultante viene filtrato, lavato prima con etanolo assoluto, quindi con etere etilico, per ottenere un residuo grezzo che, purificato per cromatografia su gel di silice, eluendo con una miscela acetato di etile : esano in rapporto 1 : 2, consente di ottenere 57 mg (0,17 mmol ; resa = 38%) del composto (**4**) (p.f. 110-112°C ; ¹H-NMR (CDCl₃, 200MHz) δ 0.89 (t, 3H, J = 6.4 Hz), 1.02 (t, 3H, J = 7.4 Hz), 1.12-1.42 (m, 24H), 2.34 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.49 (q, 2H, J = 7.6 Hz), 9.15 (br, 1H, D₂O scambiabile), 9.53 (br, 1H, D₂O scambiabile) ; MS m/e 336 M⁺).

ESEMPIO 5

Preparazione del composto di formula (I) in cui X₁ = S, X₂ = O, R₁ = - (CH₂)₁₃CH₃, R₂ = n-propile, e R₃ = R₄ = H (5)



Il composto (5) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 3, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 366 M⁺.

ESEMPIO 6

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -$
 $(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = n$ -propile, e $R_3 = R_4 = H$ (6)

Il composto (6) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 4, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 350 M⁺.

ESEMPIO 7

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -$
 $(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = n$ -butile, e $R_3 = R_4 = H$ (7)

Il composto (7) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 3, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 380 M⁺.

ESEMPIO 8

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -$
 $(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = n$ -butile, e $R_3 = R_4 = H$ (8)

Il composto (8) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 4, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 364 M⁺.

ESEMPIO 9

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -$
 $(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = i$ -butile, e $R_3 = R_4 = H$ (9)

Il composto (9) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 3, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 380 M⁺.

ESEMPIO 10

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -$

$(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = i\text{-butile}$, e $R_3 = R_4 = H$ (10)

Il composto (10) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 4, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 364 M⁺.

ESEMPIO 11

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -$

$(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = neopentile$, e $R_3 = R_4 = H$ (11)

Il composto (11) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 3, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 394 M⁺.

ESEMPIO 12

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -$

$(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = neopentile$, e $R_3 = R_4 = H$ (12)

Il composto (12) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 4, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 378 M⁺.

ESEMPIO 13

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -$

$(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = 2\text{-fenil-etile}$, e $R_3 = R_4 = H$ (13)

1999/ 111 Notarbartolo & C. et al. 1999

Il composto (13) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 3, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 428 M⁺.

ESEMPIO 14

Preparazione del composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -$
 $(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = 2$ -fenil-etile, e $R_3 = R_4 = H$ (14)

Il composto (14) è stato preparato seguendo una procedura analoga a quella descritta nell'Esempio 4, ottenendo un prodotto per il quale è risultato: MS m/e 412 M⁺.

TEST DI CITOTOSSICITA'

La citotossicità dei composti sintetizzati come descritto negli Esempi 1-14 è stata valutata utilizzando una linea cellulare di leucemia umana denominata CCRF/CEM. Le cellule CCRF/CEM sono state coltivate in mezzo di coltura contenente RPMI 1640 (90%), siero fetale bovino (10%) e interleuchina 2 (100 U/ml). Il saggio di citotossicità è stato effettuato su 104 cellule CCRF/CEM seminate in pozzetti da 35 mm in 2 ml di mezzo di coltura. Le cellule sono state trattate per 72 ore con i composti in esame e al termine del periodo di esposizione il loro numero è stato misurato e confrontato con quello di cellule di controllo trattate con C₂-ceramide al fine di determinare la percentuale di inibizione della crescita. La concentrazione in grado di inibire il 50% della crescita cellulare è stata calcolata per regressione non lineare dei dati sperimentali come descritto in M. Macchia, N. Jannitti, G.B. Gervasi, R. Danesi, *J. Med. Chem.*, (1996) 39 (7): 1352-1356.

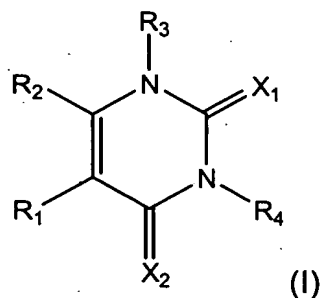
I valori di IC_{50} espressi in μM così ottenuti sono riportati nella seguente

Tabella:

| Composto | IC_{50} (μM) |
|-----------|-----------------------|
| controllo | 31,6 |
| (3) | 1,7 |
| (4) | 6,3 |
| (6) | 0,97 |
| (9) | 13,2 |
| (10) | 8,7 |
| (11) | 20 |
| (12) | 29,1 |
| (13) | 20,7 |
| (14) | 15,6 |

RIVENDICAZIONI

1. Composti di formula generale (I) :



in cui

X₁ e X₂ sono scelti tra O e S;

R₁ ed R₂ sono scelti tra $-(CH_2)_{13}CH_3$ e gruppi alchilici o alchilenici con da 2 a 6 atomi di carbonio, lineari o ramificati, non sostituiti o sostituiti con uno o più sostituenti scelti tra gruppi aromatici, amminici primari, secondari e terziari, ammonici quaternari, carbossilici, ossidrilici, eterei, atomi di alogeni o porzioni saccaridiche, con la condizione che uno solo tra R₁ ed R₂ sia sempre $-(CH_2)_{13}CH_3$;

e R₃ e R₄ sono scelti tra H e gruppi alchilici o alchilenici con da 2 a 6 atomi di carbonio, lineari o ramificati, non sostituiti o sostituiti con uno o più sostituenti scelti tra gruppi aromatici, amminici primari, secondari e terziari, ammonici quaternari, carbossilici, ossidrilici, eterei, atomi di alogeni o porzioni saccaridiche.

2. I composti di formula generale (I) secondo la rivendicazione 1, in cui:

- X₁ = S, X₂ = O, R₁ = etile, R₂ = $-(CH_2)_{13}CH_3$, e R₃ = R₄ = H [composto (1)];
- X₁ = X₂ = O, R₁ = etile, R₂ = $-(CH_2)_{13}CH_3$, e R₃ = R₄ = H [composto (2)];
- X₁ = S, X₂ = O, R₁ = $-(CH_2)_{13}CH_3$, R₂ = etile, e R₃ = R₄ = H [composto (3)];

- d) $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{etile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (4)];
- e) $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{n-propile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (5)];
- f) $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{n-propile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (6)];
- g) $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{n-butile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (7)];
- h) $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{n-butile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (8)];
- i) $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{i-butile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (9)];
- l) $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{i-butile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (10)];
- m) $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{neopentile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (11)];
- n) $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{neopentile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (12)];
- o) $X_1 = S$, $X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{2-fenil-etile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (13)];
- p) $X_1 = X_2 = O$, $R_1 = -(CH_2)_{13}CH_3$, $R_2 = \text{2-fenil-etile}$, e $R_3 = R_4 = H$ [composto (14)].

3. Processo per la preparazione dei composti di formula (I) in cui $R_3 = R_4 = H$ descritti nelle rivendicazioni 1 e 2, detto processo comprendendo i seguenti stadi :

i) reazione dell'etil estere (II) con il cloruro acilico (III) per ottenere il β -chetoestere di formula (IV);

ii) reazione del β -chetoestere di formula (IV) con tiourea (V) per ottenere il composto di formula (I) in cui X_1 è S e X_2 è O;

iii) reazione del composto di formula (I) in cui X_1 è S e X_2 è O con acido cloroacetico a refluxo per ottenere il composto di formula (I) in cui $X_1 = X_2 = O$,

dove X_1 , X_2 , R_1 e R_2 hanno i significati indicati nelle rivendicazioni 1 e 2.

4. Composizioni farmaceutiche comprendenti come principio attivo una almeno uno dei composti di formula generale (I) descritti nelle rivendicazioni 1 e 2, e/o loro derivati o sali farmaceuticamente accettabili, insieme ad eccipienti e/o diluenti.

5. Uso dei composti di formula generale (I) descritti nelle rivendicazioni 1 e 2 per la preparazione di composizioni farmaceutiche utili nel trattamento dei tumori.

(BRA)

Firenze, 21 Luglio 1999



p. BRACCO S.p.A.

il Mandatario

Rino Brighenti

Dr. Livio Brighenti

della NOTARBARTOLO & GERVASI